

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Departamento de Estomatología III

(Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial)



TRABAJO DE INVESTIGACION

**MATERIALES COMPUESTOS BASADOS EN BRUSHITA
Y POLICAPROLACTONA PARA APLICACIÓN EN
REGENERACIÓN ÓSEA**

MEMORIA DEL TRABAJO DE MASTER PRESENTADA POR

ABDULLAH JAAFER ABBUSHI

Bajo la dirección del Doctor:

Prof. Luis Blanco Jerez

Agradecimientos

Agradezco al Profesor D. Enrique López Cabarcos catedrático del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la UCM, porque bajo su dirección he realizado la preparación y caracterización de los materiales empleados en este trabajo. También quiero mencionar a todos los miembros del mismo Departamento por su colaboración y muestras de simpatía.

INDICE

1. Introducción	3
1.1 Materiales de Cementos de fosfato calcio	3
1.2 Cementos de fosfato calcio de Brushita	4
1.3 Refuerzo de los cementos de fosfato calcio	5
1.4 El polímero biocompatible poli(ϵ -caprolactona)	8
1.5 Refuerzo de los cementos de fosfato calcio con PCL	9
2. Hipótesis	11
3. Objetivos	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1 Materiales	12
4.2 Métodos	14
5. Resultados	19
5.1 Caracterización del cemento compuesto de brushita/PCL	19
5.1.1 Análisis estructural mediante difracción de rayos-X	19
5.1.2 Análisis de la morfología mediante microscopía electrónica	21
5.1.3 Evaluación de la PCL adsorbida mediante termogravimetría	27
5.2 Propiedades del cemento de brushita/PCL y análisis estadístico	29
5.2.1 Evaluación del tiempo de fraguado del cemento compuesto	29
5.2.2 Propiedades mecánicas de cementos de los 3 métodos	29
5.2.3 Análisis estadístico	30
5.3 Estudio in vitro de la citocompatibilidad del cemento compuesto	32
6. Discusión	35
7. Conclusiones	38
8. Referencias	40

1. Introduccion

La cantidad y calidad del hueso es un factor determinante del éxito de los procedimientos dentales en implantología y también es fundamental para la supervivencia de los dientes naturales. Para conseguir resultados óptimos en los tratamientos dentales en las regiones donde el hueso es deficiente es necesaria la regeneración ósea.

Hoy en día, la ingeniería de tejido óseo se enfoca en el desarrollo de biomateriales sintéticos que estimulen y mejoren el crecimiento y la formación de hueso en los sitios que tienen defectos óseos. La síntesis de estos biomateriales fue la solución que se encontró a las limitaciones que imponían los trasplantes alogénicos o autólogos, que a pesar de ser soluciones ideales para la regeneración ósea, presentan limitaciones como la escasa disponibilidad de órganos y tejidos de donantes, el posible rechazo, y el riesgo a que se somete el donante. Por estas razones la importancia de los biomateriales sintéticos crece cada día a la par que el esfuerzo por desarrollar nuevos productos para satisfacer necesidades específicas como por ejemplo regeneración ósea en pacientes osteoporóticos [1,2].

Durante las últimas décadas, se han utilizado como sustitutos de injerto óseo varios materiales sintéticos orgánicos como polímeros y otros materiales inorgánicos como cementos cálcicos [3], o compuestos de ambos. En este estudio desarrollamos un nuevo método para producir un biomaterial compuesto por un cemento de fosfato calcio (brushita) y por un polímero (poli(ϵ -caprolactona)).

1.1 Materiales de Cementos de fosfato calcio

Los cementos de calcio fosfato (CPCs) se sintetizan a partir de una fase sólida que es una mezcla de un fosfato cálcico ácido y otro básico (polvo) y una fase líquida (agua + otros elementos). Tanto la relación polvo líquido como los aditivos que se añaden en la fase líquida permiten controlar las características del cemento tales como el tiempo de fraguado, porosidad y las propiedades mecánicas [4].

Está reportado en la literatura que los cementos de fosfato calcio son beneficiosos en el campo de la regeneración ósea aunque tienen algunas limitaciones [5-11]. Entre las

ventajas se incluyen: excelente biocompatibilidad y osteoconductividad, inyectibilidad, fácilmente moldeable en su aplicación clínica (pasta de fraguado), tienen reacción de fraguado favorable en condiciones fisiológicas, y es reabsorbible. El problema principal que presentan los CPCs es que sus propiedades mecánicas son bajas [6-8] especialmente la tenacidad.

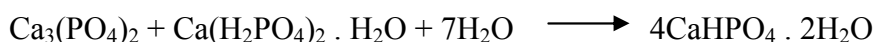
Para usos ortopédicos y dentales hay dos grupos de CPCs que se usan mayoritariamente: cementos de apatita (CHA), y cementos de brushita (CB). Ambos tipos se han investigado extensamente evaluando los factores que afectan a sus características. Los CHA demostraron tener mejores propiedades mecánicas mientras que los CB tienen una tasa de reabsorción más rápida *in vivo* que los CHA [12].

1.2 Cementos de fosfato calcio de Brushita

Este cemento se prepara mezclando una fase sólida y otra líquida hasta formar una pasta que al dejarla fraguar se convierte en un material duro. La reacción del fraguado es una reacción ácido-base [13] como se indica a continuación:

Fase sólida (polvo) + fase líquida (agua) \longrightarrow Cemento de Brushita

$(\beta\text{-TCP (base)} + \text{MCPM (ácido)})_{\text{fase sólida}} + \text{Agua} \longrightarrow \text{Cemento de Brushita}$



La brushita tiene propiedades mecánicas más bajas que los cementos de apatita [14] aunque su reabsorción es mejor [12] y por eso se utiliza en aéreas de carga baja. Su eficacia como material biocompatible y osteoconductor ha sido demostrada en estudios *in vivo* realizados en diferentes modelos animales en los cuales se observó que los defectos óseos tratados con brushita se rellenan con tejido óseo nuevo [11,15]. Otra ventaja interesante es que se puede aplicar la brushita en procedimientos de aumento óseo vertical a través de técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas [15,16] y en la prevención de la depresión temporal del hueso después de la cirugía.

Con objeto de ampliar el campo de utilización de la brushita en regeneración ósea, se ha realizado un esfuerzo considerable para mejorar sus propiedades mecánicas, controlar su tiempo de fraguado, disminuir su acidez, optimizar su macroporosidad y reducir su desintegración en pequeñas partículas. Las características de la brushita se pueden modificar a través de aditivos que se añaden como ingredientes del cemento

principalmente en la fase líquida, pero también alterando la razón polvo/líquido durante la preparación del cemento. Por ejemplo, para mejorar la cohesión del cemento se ha añadido a la fase líquida gel de sílica [17] y ácido hialurónico [18]; para prolongar el tiempo de fraguado[19] se utilizan ácidos carboxílicos especialmente ácido cítrico [20,21], y ácido glicólico [22,23]. En algunos de estos casos se ha observado que mejoraban significativamente las propiedades mecánicas del cemento de brushita (fuerza de tensión diametral) aunque la mejora no era suficiente para su aplicación clínica en aéreas de carga alta o de alto estrés mecánico y por eso se sigue investigando la manera de mejorar su fuerza mecánica, su resistencia a la flexión y su tenacidad.

1.3 Refuerzo de los cementos de fosfato calcio

El interés del refuerzo de los cementos de fosfato calcio, tanto apatita como brushita, se demuestra por el amplio número de trabajos científicos dedicados al tema. Hay que tener en cuenta que el biomaterial dentro del cuerpo está sometido no solamente a fuerzas de compresión, así que para optimizarlo es necesario evaluar parámetros clínicos como resistencia a la compresión, resistencia a la flexión, y tenacidad ya que su importancia varía según el sitio en el que se vaya a usar.

Para mejorar las propiedades mecánicas se han introducido fibras de polímeros dentro de los CPs. Se ha reportado que la incorporación de fibras poliméricas puede reforzar los cementos aunque la mejora de las propiedades mecánicas no es grande. Con este propósito se han utilizado fibras de poliamida, [24], fibras de quitosano [25-31], gelatina en combinación con quitosano [30], gelatina [32,33], fibras de carbón[34-36], poliamidas aromáticas (aramida) [34,37], polipropileno [36,38], poliamidas tipo nailón [36] poliglactina [34,39,40], plástico reforzado con vidrio [34], colágeno [41,42], copolímero de láctico y glicólico (PLGA) [33,43,44], sutura absorbible[45], polietilenglicol diacrilato (PEGDA) [46], y otros polímeros como alcohol polivinílico [32].

En estos estudios ha habido acuerdo en que la adición de fibras a los CPCs contribuye a reforzarlos y aumentar su resistencia mecánica aunque hay disparidad en su eficacia. En algunos casos la adición de fibras permite utilizar el material en aéreas de alto o moderado estrés mecánico [26-28,41,47] mientras que en otros casos el resultado no es

concluyente. En general los cementos con las fibras presentan valores de resistencia a la compresión más altos que los cementos puros [25,42,44], y lo que es más interesante aumentan su tenacidad, ductilidad, y resistencia a la flexión o tensión [26-31,40,41,43,44,47]. El tipo del material de la fibra puede afectar a la resistencia mecánica [34, 32, 36], del material compuesto y también el refuerzo sinérgico que se obtiene cuando se utiliza más de un agente de refuerzo [25,28,30].

Además se investigó la influencia de la longitud de la fibra y la fracción del volumen de las fibras en el material compuesto. Se encontró que las propiedades mecánicas se pueden mejorar con el aumento de la longitud de las fibras pero hasta un límite después del cual apenas hay influencia [34,35]. Sin embargo parece que el refuerzo no influye en el tiempo de fraguado del cemento [32,38,42]. Con respecto a la influencia de la cantidad del agente de refuerzo dentro del CPC se encontró que es un factor importante para mejorar la resistencia mecánica del material compuesto [34,35,39]. En estudios en los que estas dos variables (longitud y fracción de volumen) se estudiaron simultáneamente [34,35] se encontró que la resistencia no aumenta después de que las fibras superan una longitud de aproximadamente 75 mm y la fracción de volumen alcanza el 7%. Alge et al [46] han encontrado que el peso molecular del polímero también influye y que con polímeros de peso molecular más alto se obtienen mejores resultados. Otro factor a tener en cuenta es la estructura de las fibras, según ha demostrado Gorst et al [39], ya que la incorporación de fibras regularmente organizadas y compactadas es mecánicamente mejor que cuando se añaden de forma aleatoria.

Se sabe que un factor determinante de las propiedades mecánicas de los CPCs es la razón polvo/liquido (P/L) con que se fabrica el cemento y lo mismo ocurre en los materiales compuestos de cemento con agentes de refuerzo. A este respecto, algunos estudios informan que con valores de P/L de 3 ó 3,5 se obtienen valores de resistencia mecánica considerables [26,35,41,45].

Hasta ahora en la literatura se han encontrado dos métodos de incorporación del agente de refuerzo: i) adición de fibras de polímero durante la preparación de la pasta del cemento [25,34-37,43,45,47], ii) incorporación del polímero en la fase líquida durante la preparación del CPC [26-29,32,41,42]. Los dos métodos fueron efectivos y los cementos en ambos casos mostraron una mejora sustancial de la tenacidad, resistencia mecánica y resistencia a la flexión y a la tensión.

El enlace químico entre las fibras y el cemento no se tuvo en cuenta en la mayoría de los estudios, aunque hay controversia sobre la importancia de la utilización de agentes de acoplamiento para mejorar la eficacia del refuerzo con algunas recomendaciones de su utilización[24], mientras que en otros casos se piensa que no influye en los resultados [39]. Los mecanismos por los que el refuerzo mejora las propiedades de los CPCs se han estudiado utilizando varias técnicas, especialmente el SEM [35,37-39,44,47]. Existe acuerdo en que la mejora se debe a la capacidad de las fibras incorporadas en puentear las fisuras del CP, eliminar los defectos, y reforzar la matriz del cemento. Por ejemplo, estudios con SEM demostraron que las fibras de colágeno aparecen cubiertas con cristales del cemento [41] y aumentan mucho la cohesión del material [42]. Con difracción de rayos-X (XRD) se demostró que el refuerzo no cambia la microestructura del cemento resultante [32,39,42] .

Una propiedad requerida en las matrices de regeneración ósea es que tengan macroporosidad y generalmente los CPCs carecen de la macroporosidad necesaria para el crecimiento vascular. Los protocolos que se han seguido para crear esa macroporosidad incluyen la utilización de: partículas de manitol, fibras absorbibles como las que se usan para las suturas de cirugía [26-29,37], fibras absorbibles con diámetro ancho para conseguir un macroporo dado y que además mejoran la resistencia mecánica [25,40,47]. Sin embargo no hay acuerdo en la tasa de degradación de las fibras incorporadas al cemento, por ejemplo parece que las fibras de PLGA pueden acelerar su degradación en el material compuesto CPC-PLGA [33,43].

La adición de fibras de refuerzo no inhibió ni redujo la excelente bioactividad y biocompatibilidad de los CPCs [26,29,30,33,40] y por el contrario en algunos estudios comparativos parece que el material reforzado mejora su bioactividad y favorece el crecimiento celular [41-43]. Estudios *in vivo* utilizando materiales reforzados con fibras confirman estos resultados ya que se obtuvo buena regeneración ósea cuando el material se implantó en los animales [25,33,43]. Además los cementos reforzados se pueden utilizar al igual que los CPCs puros para liberar factores de crecimiento [29,31] , fármacos, ó células [26,29]. Merece la pena señalar que en todos los estudios realizados hasta ahora, encontrados en la literatura, solo en dos casos se utilizó el cemento de brushita [39,42] y que el resto los trabajos se realizó con cementos de apatita.

1.4 El polímero biocompatible policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es uno de los polímeros sintéticos que han sido propuestos para imitar la estructura y la textura fibrosa del colágeno en el tejido óseo natural. Se prepara mediante la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona (ver Figura 1). La PCL es un polímero lineal, semicristalino, biocompatible, biodegradable, tiene bajo punto de fusión ($\approx 60^\circ\text{C}$) y ha sido aprobado por el “U.S Food and Drug Administration” para usos médicos y liberación de medicamentos. Sin embargo el uso de este polímero ha estado limitado por su lenta degradación y reabsorción, y este hecho se ha relacionado con su hidrofobicidad y cristalinidad [48] . Por ello últimamente se han desarrollado versiones de PCL con degradación más rápida [49].



Figura 1. La polimerización del PCL

La PCL se ha combinado con varios materiales basados en fosfato cálcico con el propósito de obtener mejores propiedades mecánicas y biológicas y algunos de estos materiales se han aplicado en regeneración ósea. Así, la PCL se ha utilizado con hidroxiapatita (HA) en muchas investigaciones en las que se ensayan distintos métodos de fabricación de matrices de sustitutos óseos. Se encuentra que el uso de fibras de PCL con partículas de HA facilita la actividad celular, muestra buena bioactividad [50-52], y presenta una mejora de las propiedades mecánicas de las partículas [53-56].

También se fabricaron materiales compuestos con PCL y beta-fosfato tricalcico (β -TCP) para matrices de regeneración ósea [57-61]. Estos materiales se fabricaron con varios métodos y cuando se usan en regeneración ósea, en todos los casos hubo una mejora de la bioactividad [58,61] tanto *in vitro* [57,59,60] como *in vivo* [57,58,61]. En estos trabajos también se demostró que estos materiales se podían también utilizar para absorber y liberar elementos beneficiosos para la actividad celular como factores de crecimiento [57,58,60,61]. Y. Lei et al investigaron la degradación de estos materiales

compuestos y reportaron que aunque la degradación es lenta, fue adecuada con el proceso de la formación del tejido óseo [59]. Además la lenta degradación del PCL resultó beneficiosa cuando lo que se busca es liberar medicamentos ó proteínas a largo plazo [62-64]. Un último factor que estimula el uso de PCL es que este polímero está disponible comercialmente con varios pesos moleculares y es barato lo que facilita el uso de PCL en matrices para regeneración ósea basadas en CPCs.

1.5 Refuerzo de los cementos de fosfato calcio con PCL

Solo se han encontrado en la literatura 2 artículos en los que se utiliza PCL para reforzar CPCs [39,65]. En 2006 Gorst et al [39] utilizaron en su estudio una capa fina de PCL como recubrimiento de la superficie de la brushita y reportaron que debido a que la constante elástica del PCL es menor que la de la brushita pura, el uso de PCL no fue efectivo en mejorar la resistencia a la fluencia y la constante elástica del material compuesto, pero si aumentó su resistencia a la flexión máxima. Recientemente Yi Zuo et al [65] han incorporado fibras ultrafinas de dos polímeros, uno de ellos PCL, en un CPC (Calcibon[®]) compuesto por alfa-TCP (61%), monetita (26%), hidroxiapatita (3%) y carbonato cálcico (10%). Para fabricar las fibras se prepararon soluciones de PCL en trifluoroetanol con diferentes concentraciones de polímero y a partir de ellas se fabricaron las fibras por “electrospinning”. Se preparo un CPC con una razón polvo/liquido de 3:1 y las fibras se mezclaron manualmente con la pasta del cemento (probable distribución no uniforme de las fibras) utilizando diferentes fracciones de peso de PCL hasta alcanzar un máximo del 7%. Los resultados muestran que el diámetro de las fibras aumenta al aumentar la concentración de las soluciones del polímero. Con respecto a las propiedades mecánicas de los compuestos de CPC-PCL se reduce un poco la resistencia a la flexión y constante elástica debido al aumento de la porosidad y se mejora la tenacidad y ductilidad en comparación con los cementos sin fibras.

El mecanismo de refuerzo del CPC por las fibras de PCL se debe a que el material compuesto puede absorber más energía a través de la flexibilidad de las fibras, y también por la fricción entre las fibras y la matriz del cemento durante la deformación. Las imágenes de microscopía electrónica de la interfaz entre la matriz del cemento y las fibras de PCL muestran una clara separación entre fibras y cemento debido a la

hidrofobicidad del PCL. Los materiales compuestos presentan tiempos de fraguado menores que el control (cemento sin fibras) que se explica por la retención de líquido en el espacio interfibrilar, que equivaldría a disminuir la P/L del cemento y consecuentemente su tiempo de fraguado.

El estudio anterior es el único que discute extensamente la idea de incorporar fibras de PCL como agente de refuerzo de los CPCs y los resultados han sido prometedores. Por eso creemos que se debe continuar la investigación de materiales compuestos preparados con PCL. Hasta ahora la mayoría de las investigaciones se han enfocado en reforzar los CPCs de apatita debido a que sus propiedades mecánicas son mejores que los de brushita. Sin embargo si se quieren aprovechar las ventajas de la brushita, como es su facilidad de reabsorción, y ampliar su uso son CPCs de brushita los que más necesidad tienen de ser reforzados. Este es el motivo que nos ha llevado a la idea de incorporar PCL como agente de refuerzo en el cemento de brushita y de investigar nuevos métodos de fabricación de matrices para regeneración ósea basados en CPCs y polímero.

2. Hipótesis

Un nuevo material compuesto de brushita y poli(ϵ -caprolactona) presenta mejores propiedades mecánicas que el cemento aislado sin refuerzo polimérico sin que se altere su biocompatibilidad.

3. Objetivos

1.- Síntesis y caracterización de nuevos materiales compuestos basados en PCL y brushita usando tres diferentes métodos de preparación :

- a. Identificar la composición y microestructura del cemento compuesto mediante los patrones de difracción de rayos-X (XRD)
- b. Analizar la morfología y composición de las matrices del material de brushita/PCL sintetizadas por los tres métodos a través de la microscopia electrónica (SEM).
- c. Conocer la influencia de la concentración utilizada de PCL -en la preparación de las mezclas de los reactantes de brushita con PCL- en las cantidades obtenidas de PCL en estas mismas a través el análisis de termogravimetría (TGA).
- d. Evaluar el tiempo de fraguado del cemento compuesto.

2.- Evaluar las propiedades mecánicas de los cementos compuestos preparados con los tres métodos de fabricación de brushita/PCL con sus concentraciones diferentes de PCL según los valores de la resistencia a la tensión diametral (DTS), y consecuentemente - dependiendo de los resultados- seleccionar el método óptimo de incorporación del PCL en el cemento de brushita.

3.- Comparar estadísticamente las propiedades mecánicas (DTS) obtenidas del cemento compuesto de brushita/PCL con las del cemento de bushita sin el polímero, eligiendo una concentración adecuada de PCL del método óptimo para fabricar el cemento compuesto a través de la incorporación de PCL y estudiar la influencia de la cantidad del polímero utilizado en las propiedades mecánicas del compuesto.

4.- Comprobar la actividad celular en el material compuesto de brushita y PCL para poder aplicarlo en regeneración ósea.

4. Materiales y Métodos

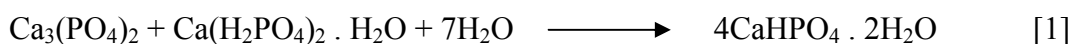
4.1 Materiales

4.1.1 Productos químicos

El PCL de peso molecular $M_w = 70.000$, el fosfato tricálcico β , el fosfato monocalcico, y el tetrahidrofurano se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.1.2 Preparacion del cemento de brushita

El cemento de brushita se preparó en el laboratorio. El cemento consta de una fase sólida formada por una mezcla de 2 gramos de fosfato tricálcico β (β -TCP) y 1,5 gramos de fosfato monocalcico (MCPM) que al mezclarse con una fase líquida, compuesta por agua destilada, fragua de acuerdo con la ecuación:



El fosfato tricálcico β se prepara mediante sinterizado de una mezcla estequiométrica de fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) y carbonato cálcico (CaCO_3), a 1100°C durante 14 horas.

4.1.3 Preparacion del material compuesto de brushita y PCL

Hemos ensayado tres métodos de fabricación de las matrices de material compuesto de cemento de brushita y PCL:

- i) Adsorción de PCL sobre los gránulos de β -TCP y luego este material (β -TCP/PCL) se utiliza como reactivo en la ecuación 1 para fabricar brushita (Método 1)
- ii) Adsorción de PCL sobre ambos, los gránulos de β -TCP y los de MCPM y luego estos materiales (β -TCP/PCL y MCPM/PCL) se utilizan como reactivos en la ecuación 1 (Método 2).
- iii) Absorción de PCL directamente sobre tabletas de brushita (Método 3).

Los dos primeros procedimientos no están reportados en la literatura mientras que el tercero es una forma usual de incorporar polímero en sustancias inorgánicas. El procedimiento incluye los siguientes pasos:

A- Los granulos de PCL se disolvieron en Tetrahydrofuran (THF). Se preparó una solución madre disolviendo 2 g de PCL en 10 ml de THF (0,2 g/ml de PCL) que se utilizó para todos los métodos.

B- En cada método, se cogieron de esta solución madre ocho cantidades diferentes 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,8 g y se prepararon ocho soluciones de distinta concentración disolviendo en 5 ml de THF. La concentración final de las 8 soluciones es la siguiente: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12 y 0,16 g de PCL/ml de THF. Se introdujeron 3 g de gránulos de β -TCP, MCPM y pastillas del cemento de brushita en estas soluciones durante varios días con agitación manual con objeto de que el polímero se adsorbiera sobre la superficie de las partículas (esquema 1).

C- A continuación se evaporó el THF a presión reducida de 70 mm/Hg durante 30 minutos.

D- Para fabricar el cemento compuesto para la fase de polvo se utilizó la misma proporción de reactantes que se usa en la síntesis del cemento de brushita, es decir : 2 g de β -TCP/PCL con 1,5 g de MCPM en el primer método; y 2 g de β -TCP/PCL con 1,5 g de MCPM/PCL en el segundo método. La razón polvo/liquido fue 2:1 y se utilizó agua destilada sin aditivos como fase liquida con objeto de no crear interferencias con el efecto del polímero.

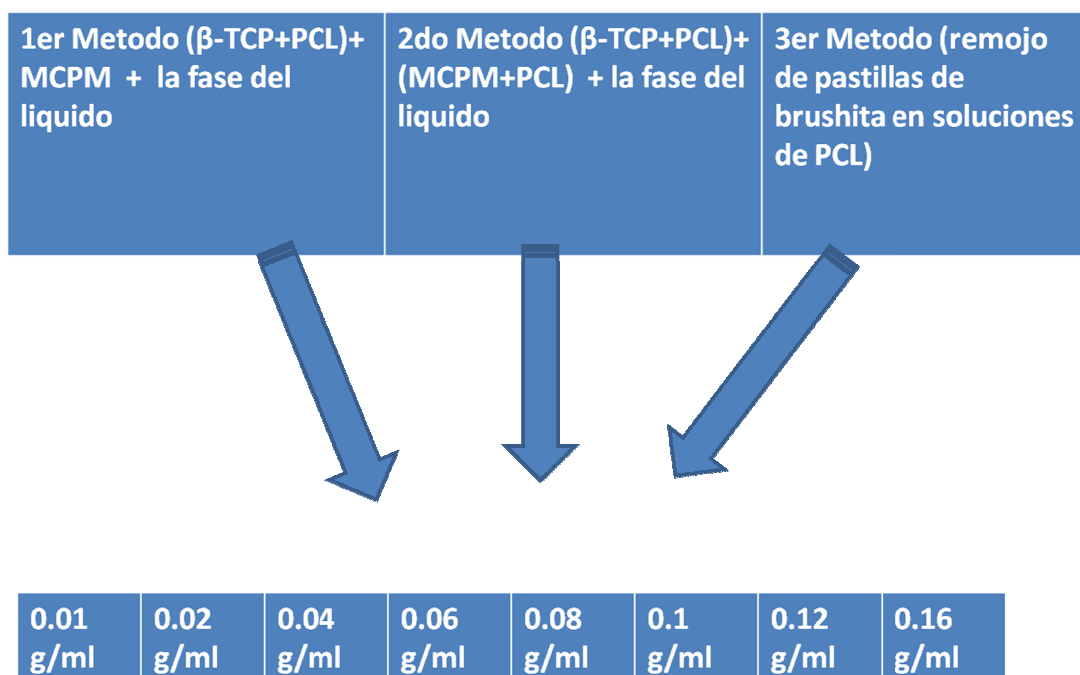
E- Las matrices de material compuesto de brushita/PCL que resulta del fraguado del cemento, se fabricaron en forma de pastillas utilizando moldes de silicona de 8 mm. Se prepararon ocho conjuntos diferentes de pastillas que corresponden a las ocho concentraciones de PCL en las soluciones utilizadas (ver Figura 2).



Figura 2. Pastillas de diámetro 8 mm

F- Para el tercer método preparamos pastillas de cemento de brushita utilizando 2 g de β -TCP y 1,5 g de MCPM como fase sólida y agua destilada como fase líquida con una razón polvo/líquido 2:1. Las pastillas se metieron en las 8 soluciones del PCL para adsorber el polímero y se dejaron por algunos días.

El esquema 1 resume los tres métodos de fabricación de materiales compuestos de brushita/PCL.



Soluciones del PCL disuelto en 5 ml de THF con diferentes cantidades del PCL disuelto que se sacan desde la solución madre

4.2 Métodos

4.2.1 Difracción de rayos-X

El análisis estructural de los cementos se realizó mediante difracción de rayos X (XRD), utilizando el difractómetro Philips X`pert (Cu-Ka radiation, 45 KV, 40 mA). Los datos se obtuvieron en el intervalo angular $2\theta=5-40^\circ$, con un tamaño de paso de 0.02° , y una velocidad de barrido angular de 1 s/paso. En el análisis de la composición mineral del cemento se utilizaron los archivos de brushita (pdf-ref 72-713), monetita (pdf-ref 71-1760), y hidroxiapatita (pdf-ref 55-592), fosfato tricálcico β (β -TCP) (pdf-ref 70-2065) y fosfato tetracálcico (pdf-ref 11-232). El propósito del análisis fue conocer si la incorporación del polímero cambia la microestructura del cemento.

4.2.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para analizar la morfología y composición de las matrices del material brushita/PCL sintetizadas por los tres métodos anteriormente mencionados, así como para investigar la interacción del polímero con la matriz inorgánica. También se realizaron medidas de SEM en muestras de brushita pura. Se utilizó el microscopio electrónico de barrido (JSM6400). Para ver la composición de la parte interior de las pastillas en los cementos compuestos se utilizaron las muestras después de haber sido rotas en las medidas de tensión diametral (DTS). Las medias pastillas se fijaron en un portamuestras de cobre utilizando una cinta de grafito, y recubriéndose posteriormente con una película de oro obtenida mediante deposición desde la fase de vapor. Las imágenes del SEM se tomaron con varias magnificaciones.

4.2.3 Termogravimetría y calorimetría diferencias de barrido

Para cuantificar la cantidad de PCL obtenida en los reactivos después del proceso de adsorción (β -TCP/PCL y MCPM/PCL) y en los cementos de brushita sintetizados a partir de los mismos se utilizó la técnica de termogravimetría (TGA), utilizando un Analizador Termogravimétrico de Mettler-Toledo. Este instrumento mide el flujo de calor a la vez que el cambio de peso que se produce en la muestra a medida que se va calentando. A una temperatura dada el PCL se descompone dando y a partir de la pérdida de peso en la muestra podemos conocer cuánto polímero contiene. Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC820 de Mettler-Toledo) para determinar la temperatura de comienzo de la descomposición de la PCL.

4.2.4 Tiempo de fraguado

El tiempo de fraguado final de los cementos compuestos de brushita/PCL se midió en condiciones atmosféricas normales en el laboratorio (20-23°C y 50-60% humedad). La medida se realizó mediante la prueba de la aguja de Vicat de 1mm de diámetro y con un peso de 400g, de acuerdo con el estándar internacional ISO1566, para los cementos dentales de fosfato de zinc. El propósito de la medida fue estudiar si la presencia del polímero dentro del cemento (el cemento compuesto) afecta al tiempo de fraguado.

4.2.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se investigaron midiendo la resistencia a la tensión diametral (Diametral Tensile Strength, DTS). Para las medidas se utilizó el equipo “Tablet Hardness Machine PTB 311E” de Pharma Test, que mide la fuerza que se aplica en el momento de la rotura de la pastilla en newton (N), su diámetro en mm, y su altura en mm. Utilizando los valores que da el aparato de estas tres variables de cada pastilla medimos la DTS utilizando la expresión :

$$\text{DTS (MPa)} = 2 F_{\max} / (\pi \times d \times l)$$

F_{\max} : fuerza a la rotura

d: diámetro de la muestra

l: altura de la muestra

Como estos materiales se quieren utilizar en regeneración ósea, conviene medir su dureza en condiciones que puedan simular las que se dan en un organismo y por ello después del fraguado del cemento las muestras se cubrieron con agua destilada y se dejaron en una estufa a 37 °C durante 24 horas antes de la prueba de dureza.

Se prepararon 3 pastillas para cada concentración de polímero y para cada método de manera que las medidas de DTS se realizaron sobre tres muestras diferentes. Los valores de DTS que se dan en este trabajo corresponden al valor promedio que resulta de las medidas realizadas en 3 muestras diferentes.

Las medias de DTS se realizan para investigar si hay una tendencia de mejorar las propiedades mecánicas con la utilización de PCL y también para comparar los resultados obtenidos con los tres métodos de incorporación del polímero.

4.2.6 Estudio in vitro de citocompatibilidad

Presentamos los resultados de las matrices preparada por el segundo método (incorporación de PCL por absorción en ambos reactantes β -TCP y MCPM durante la reacción de fraguado de la brushita) y reservamos para el desarrollo de la Tesis Doctoral los estudios biológicos de los otros métodos de síntesis. El estudio realizó en tres muestras preparadas con concentraciones de PCL disuelto: 0,02; 0,1 y 0,16 g/ml. El objetivo del estudio es mostrar la actividad celular del cemento con PCL y se realizó

con microscopía SEM; JSM6400) y tenemos la intención de completar el trabajo con el análisis estadístico de la proliferación celular en cementos compuestos de brushita/PCL preparados con distintos métodos.

Para el estudio se prepararon pastillas (en moldes de 15 mm de diámetro y 2 mm de altura) de los cementos de brushita/PCL del segundo método). Las pastillas se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH constante de $7,0 \pm 0,2$ y a continuación se secaron en estufa a 40 grados. Finalmente se desinfectaron con etanol al 70% durante una hora y se expusieron a la radiación U.V. durante 20 minutos. Posteriormente se conservaron cerradas a 40 grados en una estufa hasta su utilización.

Para la prueba de citocompatibilidad, se cultivaron las células de una línea celular de osteoblastos humanos, en el medio de cultivo DMEM (Sigma), suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina y 0,5% de L-Glutamina, en una incubadora a 5% CO₂, y 37 °C.

Las muestras (pastillas) se colocaron por triplicado, en una placa de 24 pocillos. A continuación, se sembraron las células con una densidad inicial de 10.000 células por pocillo. El crecimiento celular, se evaluó después de 1, 2 y 7 días de cultivo. Las muestras se sacaron a los correspondientes días y se lavaron con PBS para eliminar los restos del medio de cultivo (5 min.). A continuación se pasa a fijar las células depositadas en las pastillas del cemento compuesto utilizando Formalina al 10% durante 20 minutos, las muestras se lavaron otra vez con el PBS y se conservaron en el frigorífico hasta su deshidratación.

Para el estudio con el microscopio electrónico (SEM) hay que obtener muestras con células completamente deshidratadas pero que conserven su forma. Para lograrlo se realizó el proceso de deshidratación por punto crítico en el que los restos del líquido celular son sustituidos por CO₂. La preparación de las muestras (pastillas) exige una deshidratación previa con etanol en diferentes concentraciones de: 10%, 30%, 40%, 60%, 70% y 90%. Finalmente las muestras se conservaron en etanol absoluto antes de realizar el punto crítico.

4.2.7 Análisis estadístico

Para conseguir nuestro objetivo de evaluar la capacidad del PCL de reforzar los cementos de brushita decidimos hacer un estudio comparativo entre los resultados de dureza de los cementos puros de brushita (grupo de control sin PCL) y los de los compuestos de brushita/PCL (grupo de test) utilizando un análisis estadístico. Según los resultados que se obtengan en las medidas de DTS se seleccionará un método de preparación con una concentración adecuada de PCL para fabricar las muestras del cemento compuesto del grupo de test y compararlos con el control (brushita sin polímero).

Para el análisis estadístico se utilizó el método de la “t student” para dos variables independientes teniendo 10 muestras de cada uno de los dos grupos de muestras con $p < 0,05$. También un análisis de la normalidad de la distribución de las muestras elegidas de cada grupo se realizó utilizando el análisis de (Shapiro-Wilk) de normalidad, porque la normalidad es una condición para hacer el t student. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Origin 8.

5. Resultados

5.1 Caracterización de las matrices del cemento compuesto de brushita/PCL

5.1.1- Análisis estructural mediante difracción de rayos-X

Las muestras del cemento compuesto preparadas con los métodos 1, 2 y 3 y concentración de PCL 0,16 g/ml, se examinaron con XRD y sus diagramas de difracción se muestran en las figuras 3, 4 y 5 respectivamente. El diagrama de difracción de la PCL que se muestra en la figura 6 presenta dos picos a 21,4 y 23,5 grados. En las figuras 3, 4 y 5 los picos más importantes corresponden a la brushita (su posición aparece a la izquierda, código de referencia pdf-ref 72-713 en la base de datos cristalográficos) y solo algunos picos menores corresponden a β -TCP que no ha reaccionado y a fosfato de calcio hidratado. El pico de PCL a 21,4 se superpone y ensancha la reflexión de la brushita que aparece a 20,96 grados mientras que el de 23,5 es visible aunque con poca intensidad. Estos resultados indican que el PCL se ha incorporado en los cementos y su incorporación no cambio la microestructura del cemento ya que el resultado es similar al que se obtiene cuando se utilizan reactivos sin PCL absorbido.

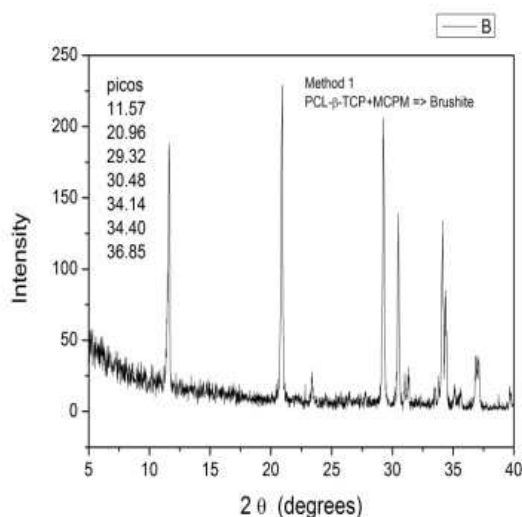


Figura 3. Diagrama de difracción de cemento preparado por el método 1

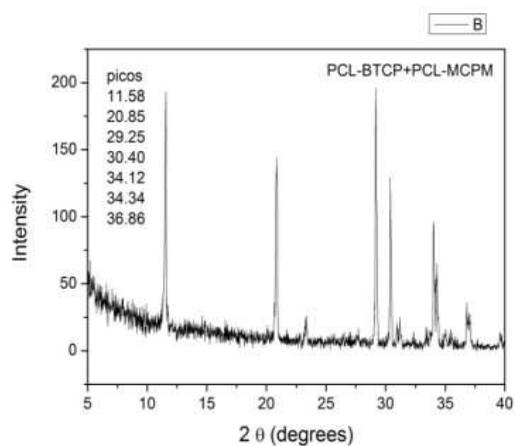


Figura 4. Diagrama de difracción de cemento preparado por el método 2

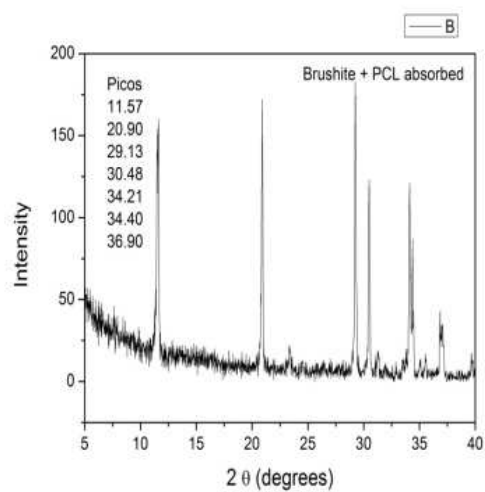


Figura 5. Diagrama de difracción de cemento preparado por el método 3

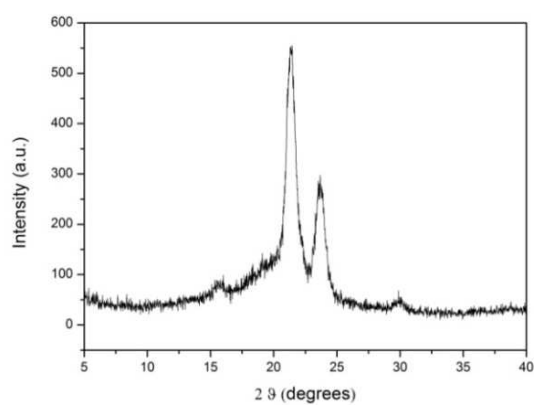


Figura 6. Diagrama de difracción del polímero PCL

5.1.2- Análisis de la morfología mediante microscopía electrónica (SEM)

Como ya se ha mencionado anteriormente, la PCL se adsorbió sobre los reactivos β -TCP y MCPM que se utilizaron para preparar la brushita (Métodos 1, y 2). La morfología de estas sustancias se muestra a continuación.

-Análisis del PCL absorbido sobre gránulos de β -TCP (β -TCP/PCL)

Cuando se utilizaron soluciones con concentración de PCL 0,02 g/mL la cantidad de polímero absorbida en las muestras de β -TCP fue escasa. La Figura 7 muestra una imagen SEM donde pueden verse los gránulos de β -TCP y solo unos pocos de ellos aparecen conectados con fibras de PCL.

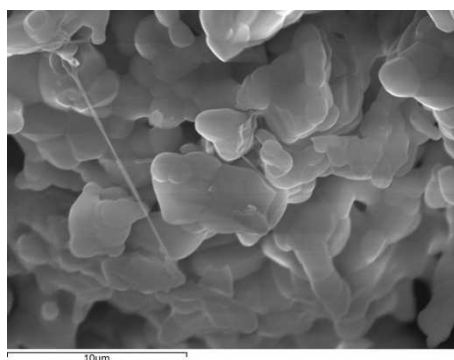
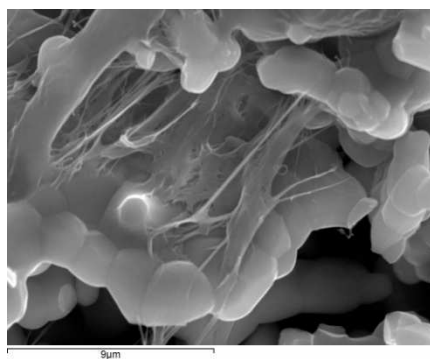
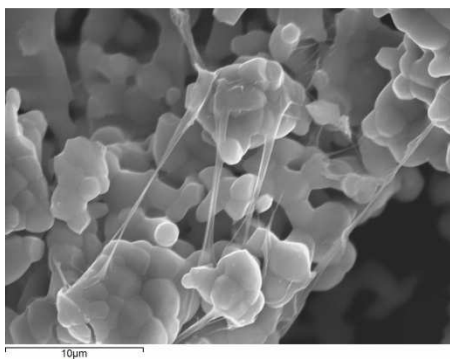


Figura 7. Micrografía de β -TCP con PCL (0,02g/mL) registrada con 4500 aumentos.

Al aumentar la concentración de las disoluciones del polímero se produjo un aumento en la cantidad de polímero absorbido tal como se muestra en las Figuras 8 y 9 que corresponden a dos zonas de una muestra preparada a partir de una disolución con 0,1 g/mL de PCL. En estas micrografías las partículas de β -TCP aparecen conectadas por múltiples fibras y laminillas de polímero.



Figuras 8 y 9. Micrografías de β -TCP /PCL preparadas por adsorción desde disoluciones 0,1g/mL de PCL. La Figura 8 (izqda.) corresponde a 3500 aumentos y la Figura 9 (dcha.) a 6000.

- *Análisis del PCL absorbido sobre gránulos de MCPM (MCPM/PCL)*

Las Figuras 10 y 11 muestran granos de MCPM después de su incubación en una solución de PCL de concentración de 0,12 (Figura 10) y 0,16 g/mL (Figura 11) respectivamente. En ambos casos el polímero aparece como una película recubriendo los cristales de MCPM.

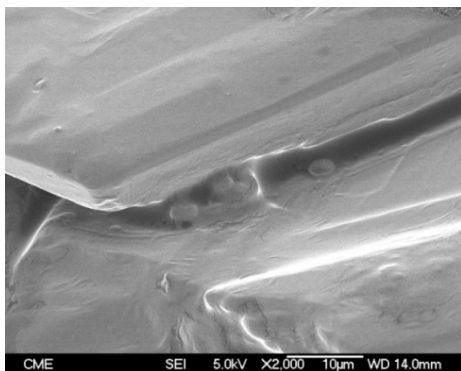


Figura 10. PCL 0,12 g/mL y 2000 aumentos.

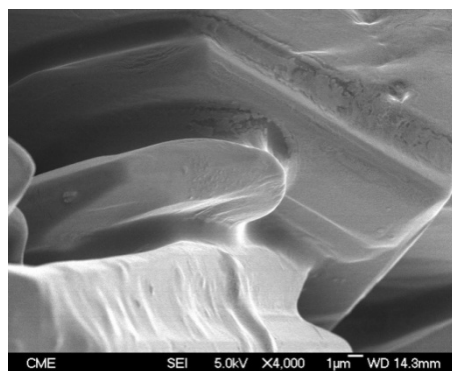


Figura 11. PCL 0,16 g/mL y 4000 aumentos

- *Análisis de los cementos compuestos preparados con método 2*

Las micrografías de los cementos de brushita preparados con los reactivos β -TCP/PCL y MCPM/PCL (método 2) se muestran en las Figuras 12, 13, 14, 15 y 16.

En la Figura 12 se muestran los cementos preparados con partículas de β -TCP y MCPM incubadas en soluciones de concentración 0,02 g/mL de PCL. En la micrografía registrada con 3000 aumentos se pueden ver restos de polímero (granos blancos) entre los gránulos de brushita aunque su cantidad no es abundante.

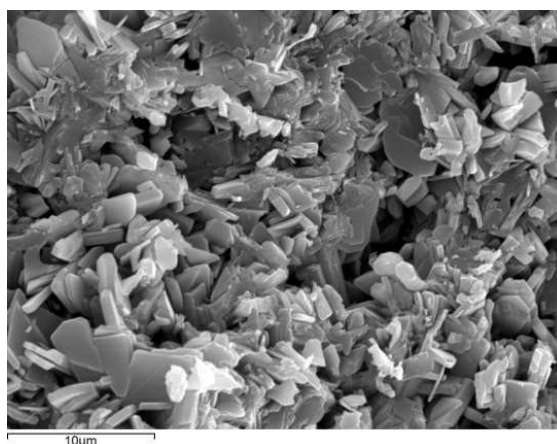


Figura 12. Brushita con PCL incubadas en soluciones de 0,02 g/mL de PCL (300 aumentos)

Cuando la concentración de la disolución de PCL en donde se incuban los gránulos aumenta hasta 0,1 g/mL se observa la aparición de fibras poliméricas dentro de la matriz del cemento tal como se muestra en la Figura 13. La distribución de las fibras en el cemento es aleatoria.

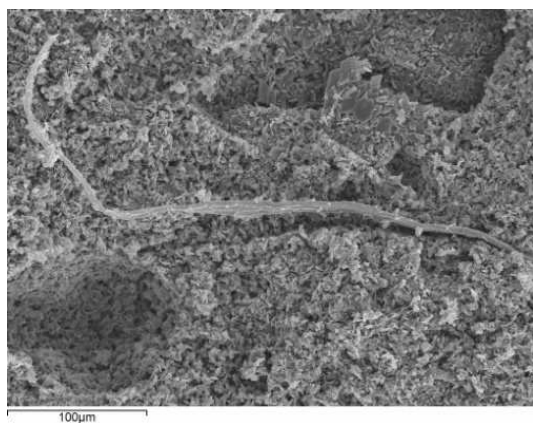


Figura 13. Micrografía registrada con 300 aumentos de cementos preparados con el método 2 e incubación de reactivos en soluciones de 0,1 g/mL de PCL. Micrografía registrada con 300 aumentos.

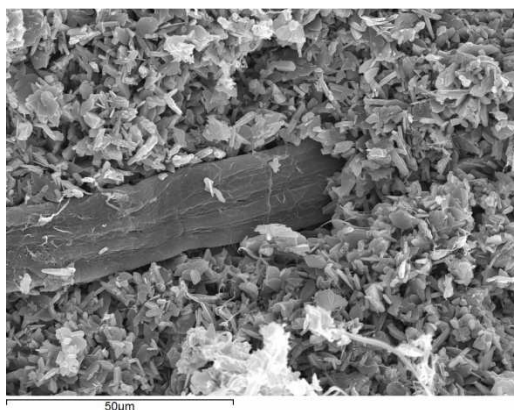
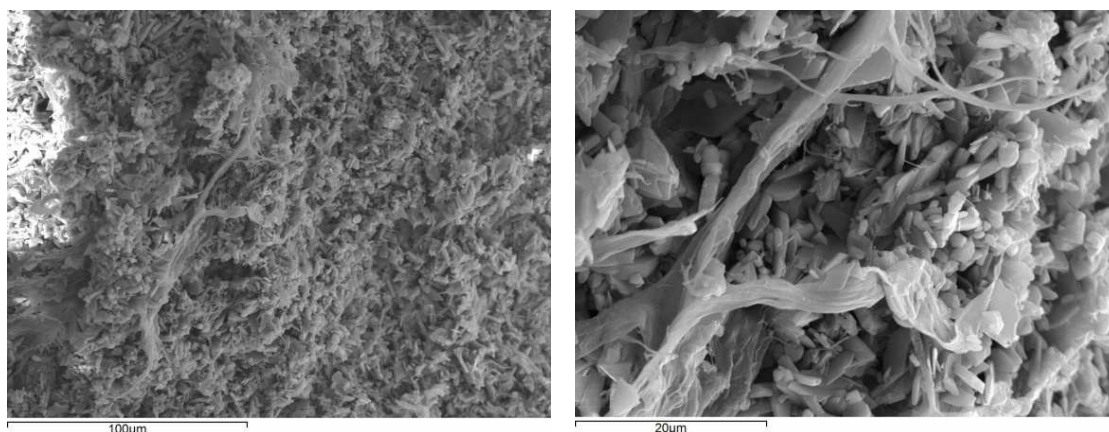


Figura 14. Detalle de la inserción de la fibrilla polimérica dentro del cemento de brushita en muestras del cemento compuesto preparadas en soluciones de 0,1 g/mL de PCL. Micrografía registrada con 1000 aumentos.

En la Figura 14 se muestra que a nivel microscópico hay separación de fases en el cemento y tanto las fibras como las pequeñas partículas poliméricas que se observan están rodeadas por gránulos de brushita pero a esta escala no se mezclan con ellos.



Figuras 15 y 16. Micrografías de cementos preparados con el método 2 con incubación de los reactivos en soluciones de concentración 0,16 g/mL de PCL. La Figura 14 (izqda.) corresponde a 500 aumentos y la Figura 15 (dcha.) a 2000 aumentos.

Al aumentar la concentración de PCL hasta 0,16 g/ml aumenta la cantidad de fibras y estructuras poliméricas dentro de la matriz del cemento tal como se muestra en las Figuras 15 y 16. Conviene recordar aquí que las fibras de PCL que en las figuras se ven en la superficie de los cementos en realidad están en su interior pues las micrografías corresponden a la zona de fractura de las muestras que se utilizaron para medidas de DTS. Las micrografías de este apartado demuestran que aunque cubiertas de PCL las partículas de β -TCP y MCPM cuando se las mezcla con agua son capaces de reaccionar y formar brushita dejando atrapado al polímero dentro del cemento ya sea formando fibras ó partículas de forma irregular.

-Análisis de los cementos preparados con el método 3 (absorción de PCL directamente sobre cementos de brushita)

El método de adsorber polímero, probablemente es el más usual en la literatura para preparar materiales compuestos de fase orgánica e inorgánica. En las Figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22 se muestran las micrografías de los materiales preparados por incubación de las pastillas de brushita en soluciones de PCL de distintas concentraciones.

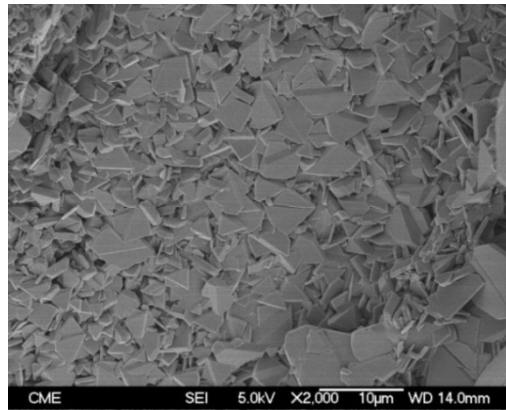


Figura 17. Cementos compuestos preparados con el método 3 incubados en disolución de PCL de concentración 0,02 g/mL. Micrografía registrada con 2000 aumentos.

La figura 17 corresponde a la brushita incubada en la solución de concentración 0,02 g/mL de PCL y no muestra restos de polímero. A esta concentración la cantidad de PCL es pequeña y la micrografía parece indicar que la adsorción se produce en la parte más externa de la pastilla de brushita y el polímero no alcanza su interior.

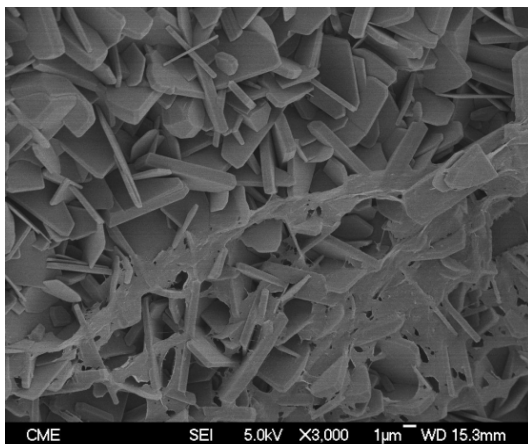


Figura 18. 0,1 g/mL PCL y 3.000 aumentos

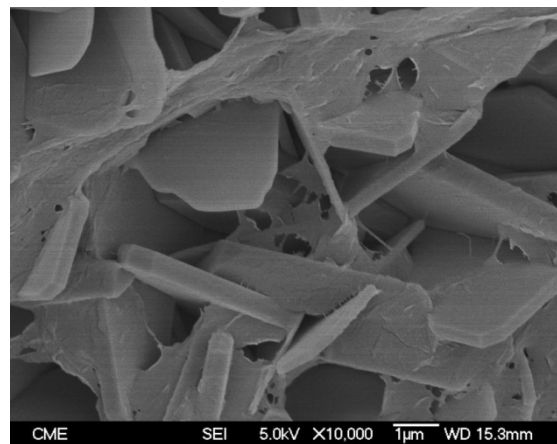


Figura 19. 0,1 g/mL PCL y 10.000 aumentos

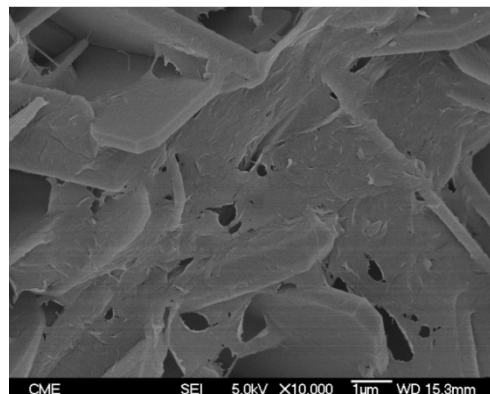


Figura 20. 0,1 g/mL PCL y 10.000 aumentos (región diferente a la mostrada en la figura 19)

Las figuras 18, 19 y 20 ilustran la morfología de los cementos incubados en disolución de PCL de concentración 0,1 g/mL. Las micrografías son registradas con 3000 aumentos en la Figura 18, y con 10.000 aumentos en las Figuras 19 y 20.

Estas figuras demuestran que la cantidad de PCL obtenida dentro del cemento compuesto se puede aumentar sustancialmente adsorbiendo directamente sobre la brushita y utilizando concentraciones altas del PCL disuelto (en este caso fue 0,1 g/mL). La figura 18 muestra que una cantidad considerable de PCL absorbido cubre y conecta los cristales del cemento y este efecto se ve con más detalle en las micrografías que se muestran en las figuras 19 y 20 que se tomaron con magnificación más alta. Sin embargo cuando los cementos de brushita se sumergen en disoluciones de concentración 0,16 g/mL de PCL la cantidad de polímero que se observa es menor tal como se ilustra en las Figuras 21 y 22.

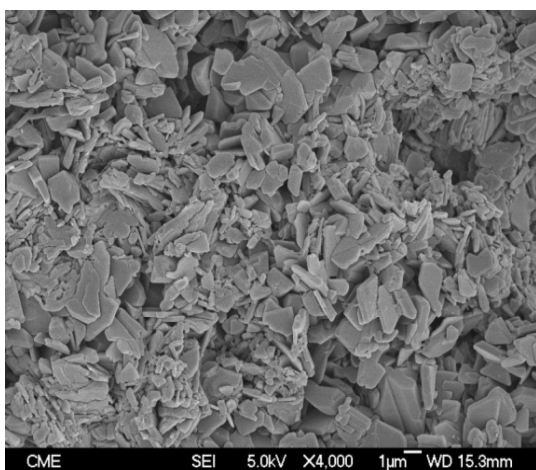


Figura 21. 0,16 g/mL PCLy 4000 aumentos

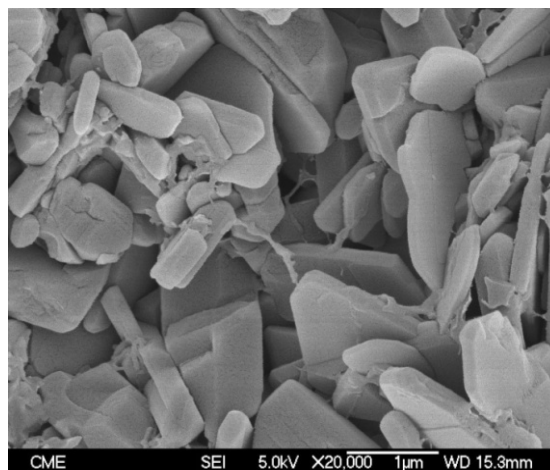


Figura 22. 0,16 g/mL PCLy 20.000 aumentos

Tal como muestran las Figuras 21 y 22 cuando la concentración del polímero en la disolución supera un cierto valor la cantidad del mismo adsorbida dentro del cemento no varía mucho o incluso disminuye. Este efecto lo atribuimos al aumento de la viscosidad de la solución polimérica que superado un cierto valor le impide difundir a través de los poros de la pastilla de brushita y penetrar por tanto en su interior.

5.1.3- Evaluación de la cantidad del PCL adsorbida mediante análisis de TGA

a. Análisis del PCL absorbido sobre β -TCP

La cantidad de PCL adsorbido se ha determinado cuantitativamente mediante termogravimetría. La temperatura de comienzo de descomposición de la PCL de $M_w=70.000$ (Hmw) se estableció en 242°C a partir de medidas de DSC tal como se muestra en la Figura 23.

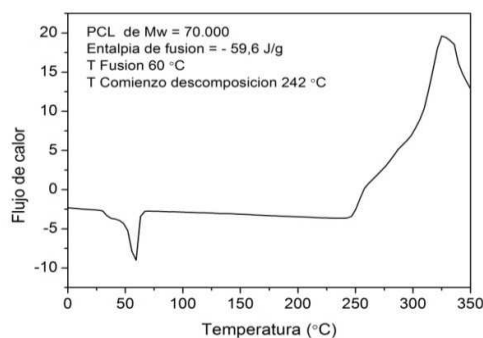


Figura 23. Curva de DSC de la PCL mostrando la fusión a 60°C y la descomposición a partir de 242°C .

Comenzamos el análisis determinando la cantidad de PCL absorbido en el β -TCP. Como se muestra en la Figura 24 la cantidad de PCL adsorbido aumenta al aumentar la concentración de la solución donde se sumergen los gránulos de β -TCP hasta que la concentración alcanza un valor alrededor de $0,1 \text{ g/mL}$ de PCL. La cantidad de PCL adsorbido no aumento para concentraciones mayores de PCL disuelto. Pensamos que esto es debido a que una vez los gránulos de β -TCP se han cubierto totalmente con una película de polímero ya no pueden adsorber mas PCL. Se encontró que este valor máximo de PCL adsorbido corresponde en nuestro caso al $1,8\%$ en peso de la muestra y debería depender del tamaño de partícula, de su porosidad, y de la viscosidad de la disolución polimérica.

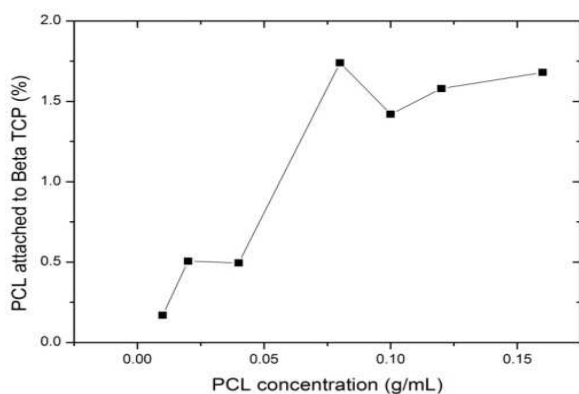


Figura 24. Cantidad de PCL absorbida en partículas de β -TCP en función de la concentración de PCL en la disolución.

b. Análisis del PCL absorbido sobre MCPM

La representación grafica en la Figura 25 muestra las curvas de pérdida de peso de las muestras MCPM incubadas en soluciones con distinta concentración de PCL.

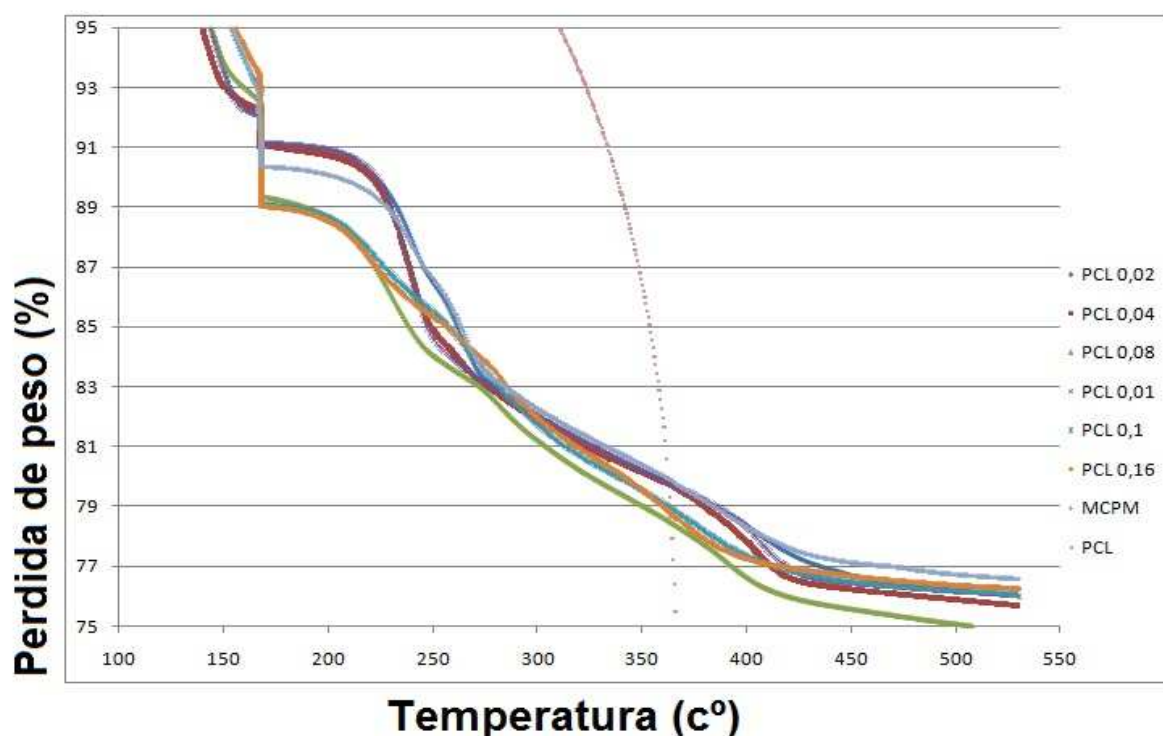


Figura 25. Curvas de TGA mostrando la pérdida de peso de las muestras sumergidas en soluciones de PCL de distinta concentración en función de la temperatura.

En estas curvas, la evaluación de la pérdida de peso debida al PCL es algo más complicada pues el MCPM tiene agua de hidratación que no se elimina hasta superar los 165-170 °C y por eso el análisis se concentró en la pérdida de peso que ocurre en el intervalo de temperatura entre 200 y 400 °C aunque a estas temperaturas también puede haber pérdidas de peso debido a la formación de pirofosfatos (se podría saber eso estudiando el MCPM solo). Como puede observarse en la Figura 25 las muestras de MCPM preparadas con concentraciones de 0,08, 0,1 y 0,16 g/mL de PCL pierden más masa (más bajas curvas en el intervalo de T entre 200 y 400 °C) que las preparadas con concentraciones 0,01, 0,02 y 0,04 g/mL. Aunque con más error la estimación de la cantidad adsorbida es análoga a la obtenida anteriormente $1,5 \pm 0,5$ % en peso.

5.2 Propiedades del cemento compuesto de brushita/PCL y análisis estadístico

5.2.1- Evaluación del tiempo de fraguado del cemento compuesto

El tiempo de fraguado de los cementos compuestos de brushita/PCL fue entre 1 y 2 minutos similar al medido para el cemento de brushita (sin polímero). Este resultado parece indicar que el PCL adsorbido en los reactivos apenas influye en la rapidez de la reacción del fraguado.

5.2.2 Propiedades mecánicas de cementos preparados con los 3 métodos

Las Figuras 26, 27 y 28 muestran la DTS en función de la concentración de PCL para los cementos compuestos preparados con método 1 (Figura 26), método 2 (Figura 27) y método 3 (Figura 28).

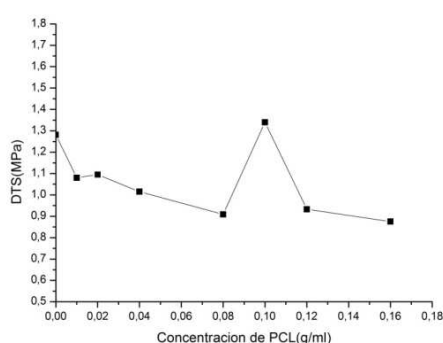


Figura 26. Cementos preparados con método 1

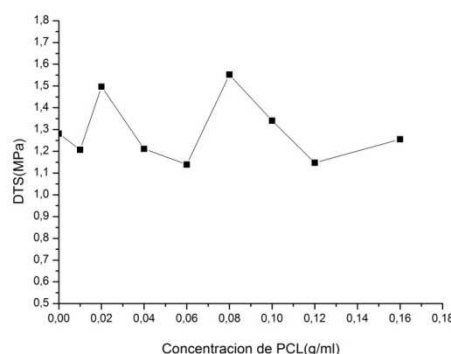


Figura 27. Cementos preparados con método 2

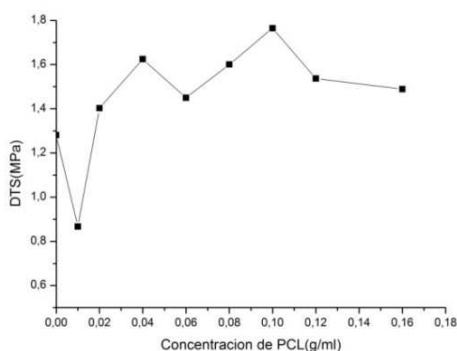


Figura 28. Cementos preparados con método 3

Los puntos negros representan la media de DTS sobre 3 muestras distintas para cada concentración de PCL. Con los métodos 1 y 2 no se observa dependencia de la DTS en

función de la PCL adsorbida. Aunque como hemos demostrado con las micrografías se ha incorporado polímero dentro de la matriz del cemento y en algunos casos aparecen fibras, la cantidad de polímero no es suficiente como para modificar las propiedades mecánicas de la brushita y habrá que mirar otras propiedades, como la cohesión, para ver si el nuevo método que proponemos presenta ventajas.

En el caso del método 3, adsorción directa de PCL sobre brushita, se observa una mejora de la DTS que se incrementa desde 1,2 MPa hasta 1,7 MPa cuando se usan concentraciones altas de PCL (0,08 – 0,16 g/mL). La explicación de esta mejora se atribuye a que el PCL al difundir por los poros de la brushita se va adsorbiendo y formando una película más o menos continua (ver Figuras 19 y 20) que contribuiría a mejorar las propiedades mecánicas del cemento. Esto no sucede en los métodos 1 y 2 donde las fibras poliméricas están aisladas y no se produce percolación de la matriz del cemento.

5.2.3 Análisis estadístico

Elegimos el método 3 y muestras preparadas con una concentración del PCL de 0,1 g/mL para compararlas con muestras del cemento de brushita sin PCL (que sería el grupo de control). Elegimos este método y concentración para fabricar las muestras del grupo de test del análisis estadístico debido a la mejora de DTS observada en este caso.

Tabla 1. Resultados del DTS de los dos grupos (en MPa)

Control (brushita puro)	Test (brushita/PCL 0,1 g/mL)
1,094	1,927
1,172	1,97
0,941	1,566
1,233	1,455
1,312	1,764
1,055	1,851
1,11	1,701
1,232	1,707
1,086	1,766
1,525	1,822

*Los resultados del análisis de Normalidad (Shapiro-Wilk) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 . Resultados del análisis de Normalidad

	DF	Statistic	Prob <W
Control	10	0,93917	0,54377
Test	10	0,96154	0,80333

Estos resultados indican que al nivel de $P < 0,05$ los datos en ambos grupos (control y test) se sacaron de una distribución normal.

*Los resultados del estudio comparativo de t student, se dan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del análisis de t student

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-8,10158	18	$P \leq 0,001$
Equal Variance NOT Assumed	-8,10158	17,9802	$P \leq 0,001$

Los resultados que se muestran en la Tabla 3 indican que al nivel de $P < 0,05$ la diferencia entre las medias de los dos grupos fue significativa.

$$m1 - m2 < 0$$

m1 : media del grupo de control

m2 : media del grupo de test

Así la hipótesis alternativa en este estudio es de que el grupo de test (brushita/PCL) tiene mejores propiedades mecánicas (valores más altos de DTS) que el grupo de control (brushita sin PCL) puede aceptarse con intervalos de confianza entre 0,4273 – 0,7265 MPa .

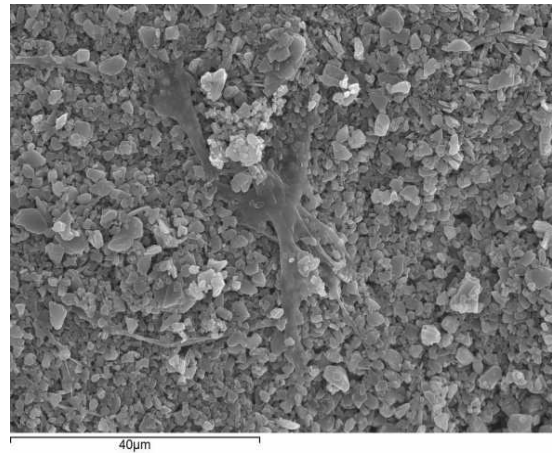
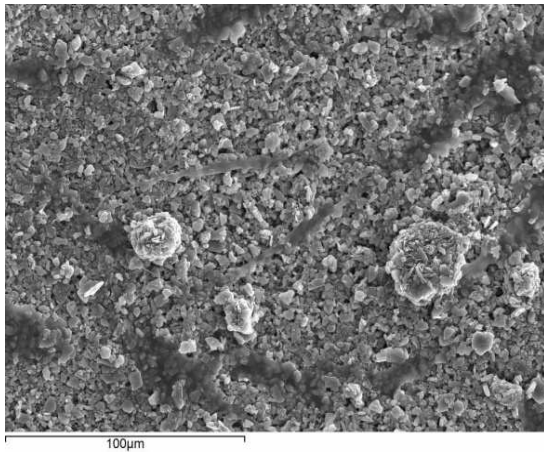
5.3 Estudio *in vitro* de la citocompatibilidad del cemento de brushita/PCL

En esta parte del trabajo se presenta un estudio cualitativo y preliminar del crecimiento celular sobre matrices del cemento de brushita/PCL preparado por el método 2. Se ha reportado que la biocompatibilidad del cemento de brushita es buena [15,23,42] y nuestro propósito fue evaluar si se mantiene o mejora por la adición de PCL. La Tabla 4 resume el protocolo empleado y la descripción del crecimiento celular según los resultados obtenidos con SEM.

Tabla 4. Descripción de la actividad celular en cementos compuestos a varios tiempos de cultivo

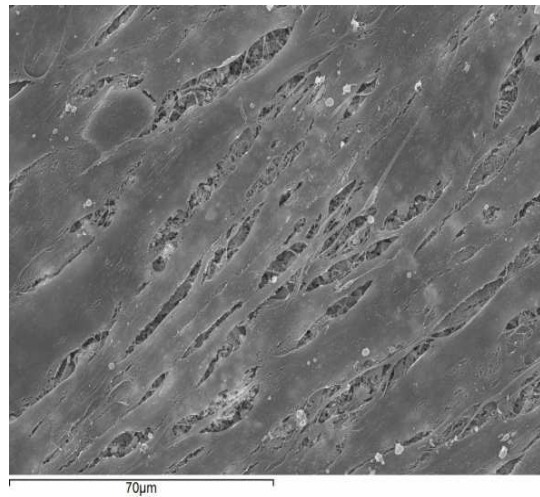
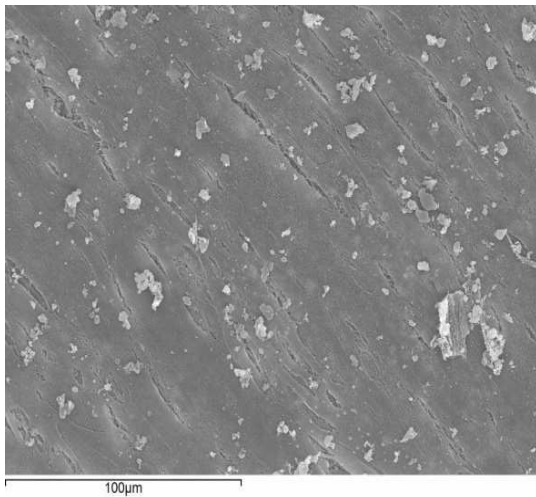
muestra	Dia 1	Dia 2	Dia 7
Incubada en 0,02 g/mL de PCL	No hay	No hay	Casi no hay (pocos restos celulares)
Incubada en 0,1 g/mL de PCL	Numerosas células (moderado)	Mas células que el dia 1(moderado)	La superficie de la pastilla aparece cubierta de una capa de células (confluyente)
Incubada en 0,16 g/mL de PCL	Algunas células (moderado)	Mas células que el dia 1(moderado)	La superficie de la pastilla aparece cubierta de una capa de células (confluyente)

Los resultados preliminares demuestran una buena respuesta de los osteoblastos a los cementos compuestos y se confirma que la utilización de PCL con la brushita no afecta al crecimiento celular y citocompatibilidad del material. Más bien al contrario, tal como se muestra en las Figuras 29 y 30, para los cementos con 0,1 y 0,16 g/ml de PCL, ya después de un día (Figura 29) y dos días (Figura 30) se puede observar que los osteoblastos se muestran con los pseudopodios extendidos colonizando la superficie del material.



Figuras 29 y 30. Muestras de los cementos de 0,1 g/mL de PCL al día 1 de cultivo (Figura 29 tomada a 500 aumentos) y de 0,16 g/mL de PCL al día 2 de cultivo (Figura 30 tomada a 1300 aumentos)

Después de 7 días la superficie de los cementos aparece completamente cubierta con una capa de osteoblastos tal como se muestra en la Figuras 31 (concentración de PCL 0,1 g/mL) y 32 (concentración de PCL 0,16 g/mL).



Figuras 31 (izqda.) y 32 (dcha.). Micrografías del crecimiento de osteoblastos el día 7 en cementos preparados con 0,1g/mL de PCL (Figura 29, tomada a 500 aumentos) y con 0,16 g/mL de PCL (Figura 30 tomada a 800 aumentos).

La figura 33 muestra un detalle de la interacción entre los osteoblastos y la matriz del cemento compuesto (0,16 g/mL de PCL a los 7 días de cultivo).

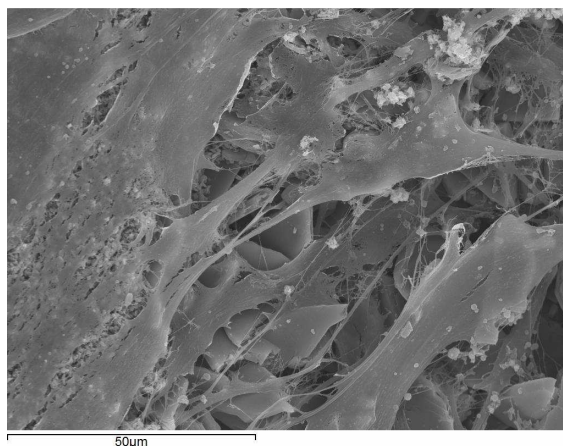


Figura 33. Micrografías de osteoblastos el día 7 en cementos con 0,16 g/mL de PCL (1000 aumentos)

En este grupo de experimentos los cementos preparados con 0,02 g/mL de PCL apenas mostraron actividad celular y en su superficie solo se observaron restos celulares específicamente al día 7 del cultivo (Figura 34). Sin embargo, más que a la falta de PCL atribuimos este resultado a problemas con algún artefacto o sesgo en el proceso general ya que en anteriores estudios [66] se ha demostrado que los cementos de brushita presentan buena actividad y proliferación celular las cuales aumentan hasta alcanzar un máximo al cabo de 7 días momento en el cual las células cubren completamente la superficie del material.

Las células son material delicado y por eso creemos que cualquier problema en el sembrado ó la distribución de las células dentro del medio de cultivo podría ser la causa del resultado obtenido. Estamos en proceso de repetir el estudio para descartar los posibles sesgos de procedimiento.

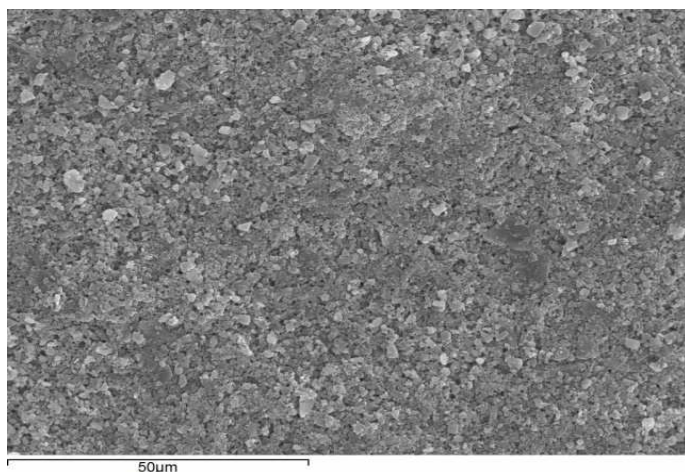


Figura 34. Cemento con 0,02 g/mL de PCL el día 7 de cultivo (1000 aumentos) mostrando pocas células, mayormente restos celulares.

6. Discusión

Aunque la idea de reforzar los cementos de fosfato cálcico con fibras de polímeros ha probado su eficacia en investigaciones previas este efecto apenas se ha investigado en cementos de brushita. En este trabajo mostramos la posibilidad de utilizar distintos métodos para incorporar por primera vez el polímero PCL a la matriz del cemento de brushita con la idea de obtener nuevos materiales compuestos para regeneración ósea.

Se ha ensayado un método nuevo de incorporar PCL a la matriz del cemento a partir de la adsorción del polímero en uno ó en ambos de los reactivos que se utilizan para preparar brushita. En este trabajo se demuestra que con este método se puede incorporar polímero en la matriz del cemento pero su cantidad es reducida ya que viene limitada por la cantidad de PCL adsorbida sobre las partículas de los reactivos. Con objeto de estudiar solamente el efecto del polímero no se han añadido aditivos en la fase acuosa, que pudieran mejorar las propiedades mecánicas de la brushita, y se ha utilizado agua como fase líquida del cemento. Aunque se demuestra que dentro del cemento hay estructuras y fibras poliméricas su cantidad no es suficiente como para provocar una mejora sustancial de las propiedades mecánicas del material.

Con respecto al Método 2 se ha demostrado que tanto el β -TCP como el MCPM aunque estén cubiertos con una película de polímero actúan como reactivos dando brushita. A este respecto los cementos compuestos obtenidos a partir de los 3 métodos tienen una estructura similar de brushita [32,39,42].

Cuando se incorpora PCL a la brushita usando el método 3 de adsorción a partir de disolución en un solvente orgánico que se evapora fácilmente (Yi Zuo et al [65]) se observa una mejora de las propiedades mecánicas del material. Este método también presenta un límite en la cantidad de polímero que se puede incorporar al cemento que viene dado por la viscosidad de la disolución polimérica y el tamaño de poro del cemento. Conviene señalar que tanto el Método 2 como el 3 son fáciles de aplicar y ambos presentan limitaciones en la cantidad de polímero que se puede incorporar. Haría falta un estudio que relacionara el tamaño de partícula con la cantidad de polímero en el Método 2 y de viscosidad y tamaño de poro con cantidad de polímero en el Método 3 para determinar los límites de estos métodos.

Los estudios morfológicos con SEM demuestran que con el Método 2 la PCL no se distribuye homogéneamente por la matriz del cemento sino que aparece formando fibras y partículas que a nivel microscópico aparecen segregadas del material inorgánico. En caso del material preparado con el Método 3 la PCL aparece como una fina película que recubre y conecta los cristales de brushita.

El análisis de TGA nos dio una idea sobre la influencia de la concentración de PCL utilizada durante la preparación de las mezclas de PCL/ β -TCP y PCL/MCPM -que se usan en la síntesis de los compuestos de los métodos 1 y 2- en la cantidad del PCL adsorbida en estas mezclas. A través de este análisis ha sido posible identificar un valor de la concentración de PCL (0,08 – 0,1 g/mL) a partir de lo cual no aumento adicionalmente la cantidad adsorbida. Será necesario en el futuro completar este análisis con muestras de cementos compuestos formados.

El rango de tiempo de fraguado del cemento compuesto es similar al del cemento de brushita sin polímero. Este resultado está de acuerdo con investigaciones previas en las que se reporto que la adición de fibras al cemento de fosfato cálcico no influía en el tiempo de fraguado[32,38,42].

El análisis estadístico demuestra que las propiedades mecánicas de las muestras del Método 3 presentan una clara mejora en comparación con los cementos de brushita sin PCL. El valor de la DTS aumenta al aumentar la concentración del PCL hasta alcanzar un máximo para muestras preparadas con disoluciones de concentración 0,08 – 0,1 g/mL de PCL. A partir de esa concentración no se observo un aumento adicional que atribuimos a la dificultad de la solución polimérica para difundir por los poros de la matriz de brushita. Para conseguir mayores aumentos, en la literatura se recurre a la incorporación directa de fibras de polímero que percolan la matriz del cemento y le proporcionan propiedades elásticas y aumentan su ductilidad del polímero [25,42,44,39,65]. El valor de 0,08 – 0,1 g/mL de PCL parece que es un valor critico que puede ser un límite a la mejoría adicional en el DTS y también a la cantidad del PCL adsorbida como se ha discutido previamente en el análisis de TGA.

Una vez que se tiene la PCL incorporada en la matriz de brushita una forma sencilla de aumentar los valores de DTS es calentado la muestra por encima de 60°C para fundir la PCL dentro del cemento. En las pruebas realizadas se ha encontrado que con este procedimiento el valor de la DTS aumenta sustancialmente (en una prueba de muestras

del método 3 preparados con 0,12 g/mL de PCL el DTS aumento al calentar desde 1,5 a 4 MPa) y vale la pena explorar esta idea en el futuro. Si a ello añadimos la utilización de aditivos en la fase líquida para reforzar el cemento que se reportan en la literatura como el cítrico ácido [20,21], y el ácido glicólico [22,23]; ó modificar el razón de polvo/liquido que en este estudio se mantuvo constante ($P/L = 2:1$) pero que algunos autores recomiendan ($P/L=3$ ó $3,5:1$) [26,35,41,45], podría obtenerse un material de brushita con propiedades mecánicas considerablemente optimizadas.

El estudio preliminar sobre la bioactividad (citocompatibilidad) de los cementos compuestos demuestra que estos materiales permitieron el crecimiento celular. Este resultado está en acuerdo con estudios realizados cementos de fosfato cálcico reforzados con fibras de polímeros que también mantuvieron la bioactividad y biocompatibilidad de los CPCs [26,29,30,33,39, 40,65]. Y como se ha mencionado previamente planteamos ampliar el estudio para confirmar nuestros hallazgos y también para evaluar la bioactividad de muestras del cemento compuesto preparadas con los otros métodos especialmente el método 3 que generalmente mostro resultados favorables en esta investigacion y además tener en cuenta utilizar un análisis estadístico.

7. Conclusiones

1- Se han desarrollado unos nuevos métodos (Métodos 1 y 2) para preparar matrices de cementos de brushita con poli(ϵ -caprolactona) que consiste en utilizar como reactivos β -TCP y MCPM sobre los que se ha adsorbido PCL. Los materiales preparados por este método se comparan con los preparados por adsorción directa de PCL sobre brushita (método 3). La caracterización del cemento compuesto resultado incluye:

a. La incorporación de PCL no cambio la microestructura del cemento ya que el resultado es similar al que se obtiene cuando se utilizan reactivos sin PCL absorbido.

b. El PCL se encontró en la matrices de los cementos preparados con los tres métodos y apareció en la forma de fibras o partículas irregularmente distribuidas (métodos 1 y 2) o películas o capas que cubren y conectan los cristales del cemento (método 3), eso puede dar una ventaja al método 3. Se pudo notar eso con el uso de más altas concentraciones de PCL, pero al llegar un punto determinado de la concentración (casi 0,1 g/mL) no hubo diferencia en la morfología y la composición observadas.

c. En general los cementos compuestos preparados con concentraciones de PCL a partir de (0,08 - 0,1 g/mL) presentaron mayor cantidad de polímero en la matriz de brushita, pero también a partir de esta dicha concentración la cantidad de polímero se estabiliza debido a que el aumento de la viscosidad de la disolución dificulta la difusión del polímero dentro de la matriz. Estos resultados fueron basados en las cantidades absorbidas en las mezclas de PCL con reactantes por TGA, y además las observaciones de SEM para ambos, los cementos compuestos y las mezclas. Próximamente será necesario evaluar la cantidad de PCL dentro de estos cementos compuestos por el TGA.

d. El PCL adsorbido en los reactivos no influye significativamente en la rapidez de la reacción del fraguado.

2- Las mejores propiedades mecánicas se obtuvieron con las pastillas del cemento preparadas con el Método 3, esta mejora se atribuye a que el PCL al difundir por los poros de la brushita se va adsorbiendo y formando una película más o menos continúa. Con respecto a la influencia de la concentración de PCL utilizada se encontró que a partir del valor de (0,08 - 0,1 g/mL de PCL) no se observó un aumento del DTS

obtenido. Hemos observado que como el punto de fusión de la PCL es bajo, una vez que el polímero está incorporado en el cemento se pueden mejorar considerablemente sus propiedades mecánicas simplemente calentando por encima de 60 °C para fundir la PCL, esta observación será objeto de una futura línea de investigación.

3- Los cementos compuestos de brushita/PCL preparados con el método 3 a 0,1 g/mL de PCL mostraron una mejoría en las propiedades mecánicas (DTS) estadísticamente significativa respecto a los cementos puros de brushita (sin PCL).

4- Los cementos compuestos de brushita/PCL conservaron la citocompatibilidad y permitieron el crecimiento celular en experimentos *in vitro* con osteoblastos.

8. Referencias

1. Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthopaedica Belgica*, **69** (2003) 1.
2. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. **71** (6) (2001) 354-61.
3. Brown PW, Chow LC. A new calcium phosphate water setting cement. In: Brown PD, editor. *Proceedings of the American Ceramic Society*. Westerville, OH; (1986) 352-379.
4. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J Mater Sci Mater Med*. **10**(3) (1999) 169-76.
5. Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont*. **15**(5) (2006) 321-8.
6. Chow LC. Calcium phosphate cements: chemistry, properties, and applications. *Mater Res Symp Proc* **599** (2000) 27–37.
7. Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Sisson GA. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. *Plast Reconstr Surg* **90** (1992) 174–91.
8. Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. BoneSource™ hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* **43B** (1998) 428–32.
9. Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop Relat Res*. **395** (2002) 23-32.
10. Heini PF, Berlemann U, Kaufmann M, Lippuner K, Fankhauser C, van Landuyt P. Augmentation of mechanical properties in osteoporotic vertebral bones--a biomechanical investigation of vertebroplasty efficacy with different bone cements. *Eur Spine J*. **10**(2) (2001) 164-71.

11. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. **26(21)** (2005) 4383-94.
12. Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res*. **28(2)** (2000) 136-40.
13. Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* **24(23)** (2003) 4123-31.
14. Charrière E, Terrazzoni S, Pittet C, Mordasini PH, Dutoit M, Lemaître J, Zysset PH. Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. *Biomaterials* **22(21)** (2001) 2937-45.
15. Tamimi F, Torres J, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Habibovic P, Luceron E, Barralet JE. Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. *Biomaterials* **30(2)** (2009) 208-16.
16. Ji C, Ahn JG. Clinical experience of the brushite calcium phosphate cement for the repair and augmentation of surgically induced cranial defects following the pterional craniotomy. *J Korean Neurosurg Soc*. **47(3)** (2010) 180-4.
17. Alkhraisat MH, Rueda C, Jerez LB, Tamimi Mariño F, Torres J, Gbureck U, Lopez Cabarcos E. Effect of silica gel on the cohesion, properties and biological performance of brushite cement. *Acta Biomater*. **6(1)** (2010) 257-65.
18. Alkhraisat MH, Rueda C, Mariño FT, Torres J, Jerez LB, Gbureck U, Cabarcos EL. The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion. *Acta Biomater*. **5(8)** (2009) 3150-6.
19. Tamimi-Mariño F, Mastio J, Rueda C, Blanco L, López-Cabarcos E. Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel. *J Mater Sci Mater Med*. **18(6)** (2007) 1195-201.

20. Hofmann M, Lilley K, Gbureck U, Barralet J. Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants. In: *Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials. Naples*; (2005) 411-418.
21. Lilley KJ, Gbureck U, Wright AJ, Farrar D, Barralet JE. Investigation into carboxylic acids as cement reactants. *Key Eng Mater* **309/311** (2006) 853-856.
22. Mariño FT, Torres J, Hamdan M, Rodríguez CR, Cabarcos EL. Advantages of using glycolic acid as a retardant in a brushite forming cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **83(2)** (2007) 571-9.
23. Mariño FT, Torres J, Tresguerres I, Jerez LB, Cabarcos EL. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. *J Biomed Mater Res A.* **81 (1)** (2007) 93-102.
24. dos Santos LA, de Oliveira LC, da Silva Rigo EC, Carrodéguas RG, Boschi AO, Fonseca de Arruda AC. *Fiber reinforced calcium phosphate cement. Artif Organs.* **24(3)** (2000) 212-6.
25. Lian Q, Li DC, He JK, Wang Z. Mechanical properties and in-vivo performance of calcium phosphate cement-chitosan fibre composite. *Proc Inst Mech Eng H.* **222 (3)** (2008) 347-53.
26. Xu HH, Simon CG Jr. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* **26(12)** (2005) 1337-48.
27. Xu HH, Burguera EF, Carey LE. Strong, macroporous, and in situ-setting calcium phosphate cement-layered structures. *Biomaterials.* **28(26)** (2007) 3786-96.
28. Xu HH, Quinn JB, Takagi S, Chow LC. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials.* **25(6)** (2004) 1029-37.
29. Xu HH, Weir MD, Simon CG. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dent Mater.* **24(9)** (2008) 1212-22.

30. Pan Z, Jiang P, Fan Q, Ma B, Cai H. Mechanical and biocompatible influences of chitosan fiber and gelatin on calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **82(1)** (2007) 246-52.
31. Weir MD, Xu HH. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* **94(1)** (2010) 223-33.
32. Miyazaki K, Horibe T, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC. Polymeric calcium phosphate cements: analysis of reaction products and properties. *Dent Mater.* **9(1)** (1993) 41-5.
33. Liao H, Walboomers XF, Habraken WJ, Zhang Z, Li Y, Grijpma DW, Mikos AG, Wolke JG, Jansen JA. Injectable calcium phosphate cement with PLGA, gelatin and PTMC microspheres in a rabbit femoral defect. *Acta Biomater.* **7(4)** (2011) 1752-9.
34. Xu HH, Eichmiller FC, Giuseppetti AA. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers. *J Biomed Mater Res.* **52(1)** (2000) 107-14.
35. Xu HH, Eichmiller FC, Barndt PR. Effects of fiber length and volume fraction on the reinforcement of calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med.* **12(1)** (2001) 57-65.
36. dos Santos LA, Carrodéguas RG, Boschi AO, Fonseca de Arruda AC. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res A.* **65(2)** (2003) 244-50.
37. Xu HH, Quinn JB, Takagi S, Chow LC, Eichmiller FC. Strong and macroporous calcium phosphate cement: Effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *J Biomed Mater Res.* **57(3)** (2001) 457-66.
38. Buchanan F, Gallagher L, Jack V, Dunne N. Short-fibre reinforcement of calcium phosphate bone cement. *Proc Inst Mech Eng H.* **221(2)** (2007) 203-11.
39. Gorst NJ, Perrie Y, Gbureck U, Hutton AL, Hofmann MP, Grover LM, Barralet JE. Effects of fibre reinforcement on the mechanical properties of brushite cement. *Acta Biomater.* **2(1)** (2006) 95-102.

40. H.H.K. Xu and C.G. Simon, Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: reinforcement, macropores, and cell response, *J Biomed Mater Res A* **69** (2004) 267–278
41. Moreau JL, Weir MD, Xu HH. Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: mechanical and cellular properties. *J Biomed Mater Res A*. **91(2)** (2009) 605-13.
42. Tamimi F, Kumarasami B, Doillon C, Gbureck U, Le Nihouannen D, Cabarcos EL, Barralet JE. Brushite-collagen composites for bone regeneration. *Acta Biomater.* **4(5)** (2008) 1315-21.
43. Dagang G, Haoliang S, Kewei X, Yong H. Long-term variations in mechanical properties and in vivo degradability of CPC/PLGA composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **82(2)** (2007) 533-44.
44. Qi X, Ye J, Wang Y. Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* **89(4)** (2009) 980-7.
45. Burguera EF, Xu HH, Takagi S, Chow LC. High early strength calcium phosphate bone cement: effects of dicalcium phosphate dihydrate and absorbable fibers. *J Biomed Mater Res A.* **275(4)** (2005) 966-75.
46. Alge DL, Chu TM. Calcium phosphate cement reinforcement by polymer infiltration and in situ curing: a method for 3D scaffold reinforcement. *J Biomed Mater Res A*. **94(2)** (2010) 547-55.
47. Xu HH, Quinn JB. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials.* **23** (1) (2002) 193-202.
48. Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev.* **108(11)** (2008) 4754-83.
49. Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, Oh JS, Akaike T, Cho CS. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials.* **24(5)** (2003) 801-8.

50. Fang R, Zhang E, Xu L, Wei S. Electrospun PCL/PLA/HA based nanofibers as scaffold for osteoblast-like cells. *J Nanosci Nanotechnol.* **10(11)** (2010) 7747-51.
51. Scaglione S, Ilengo C, Fato M, Quarto R. Hydroxyapatite-coated polycaprolacton wide mesh as a model of open structure for bone regeneration. *Tissue Eng Part A.* **15(1)** (2009) 155-63.
52. Wutticharoenmongkol P, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P. Novel bone scaffolds of electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* **6(2)** (2006) 514-22.
53. Wutticharoenmongkol P, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P. Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *Macromol Biosci.* **6(1)** (2006) 70-7.
54. Tyagi P, Catledge SA, Stanishevsky A, Thomas V, Vohra YK. Nanomechanical properties of electrospun composite scaffolds based on polycaprolactone and hydroxyapatite. *J Nanosci Nanotechnol.* **9(8)** (2009) 4839-45.
55. Shor L, Güçeri S, Wen X, Gandhi M, Sun W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials.* **28(35)** (2007) 5291-7.
56. Sun JJ, Bae CJ, Koh YH, Kim HE, Kim HW. Fabrication of hydroxyapatite-poly(epsilon-caprolactone) scaffolds by a combination of the extrusion and bi-axial lamination processes. *J Mater Sci Mater Med.* **18(6)** (2007) 1017-23.
57. Bina Rai , Jane L. Lin , Zophia X.H. Lim , Robert E. Guldberg , Dietmar W. Hutmacher ,Simon M. Cool . Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL-TCP scaffolds. *Biomaterials* **31** (2010) 7960-7970.
58. Sunny A. Abbah , Christopher XL. Lam , Dietmar W. Hutmacher , James CH. Goh , Hee-Kit Wong. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials* **30** (2009) 5086–5093.

59. Lei Y, Rai B , Ho KH, Teoh SH . In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone -20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science and Engineering C* **27** (2007) 293–298.
60. Cevat Erisken, Dilhan M. Kalyon*, Hongjun Wang. Functionally graded electrospun polycaprolactone and b-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials* **29** (2008) 4065–4073.
61. Sun-Jong Kim, Myung-Rae Kim, Jin-Sub Oh, Inho Han, and Sang-Wan Shin. Effects of Polycaprolactone-Tricalcium Phosphate, Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Dog Mesenchymal Stem Cells on Bone Formation: Pilot Study in Dogs. *Yonsei Med J* **50(6)** (2009)825-831.
62. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm.* **278(1)** (2004)1-23.
63. Quaglia F, Ostacolo L, Nese G, De Rosa G, La Rotonda MI, Palumbo R, Maglio G. Microspheres made of poly(epsilon-caprolactone)-based amphiphilic copolymers: potential in sustained delivery of proteins. *Macromol Biosci.* **25(10)** (2005) 945-54.
64. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials.* **25(7-8)** (2004) 1279-87.
65. Zuo Y, Yang F, Wolke JG, Li Y, Jansen JA. Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration. *Acta Biomater.* **6 (4)** (2010)1238-47.
66. Alkhraisat MH, Moseke C, Blanco L, Barralet JE, López-Cabarcos E, Gbureck U. Strontium modified biocements with zero order release kinetics. *Biomaterials* **29** (2008) 4691-4697.